

Brief English Description of German Patent Application Number 41 33 643 C1

Determination of the fat or oil content of substances with high water content, in particular of food, is accomplished with a low resolution NMR spectrometer. Prior to the NMR measurement, the substance is mixed with a chemical drying agent, preferably with CaO powder. The protons originally in free water are then rigidly bound and their short T2 time permits discrimination.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Patentschrift
⑩ DE 41 33 643 C 1

⑤① Int. Cl.⁵:
G 01 N 33/02
G 01 N 24/08

②① Aktenzeichen: P 41 33 643.7-52
②② Anmeldetag: 11. 10. 91
④③ Offenlegungstag: —
④⑤ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 3. 12. 92

DE 41 33 643 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦③ Patentinhaber:

Bruker Analytische Meßtechnik GmbH, 7512
Rheinstetten, DE

⑦② Erfinder:

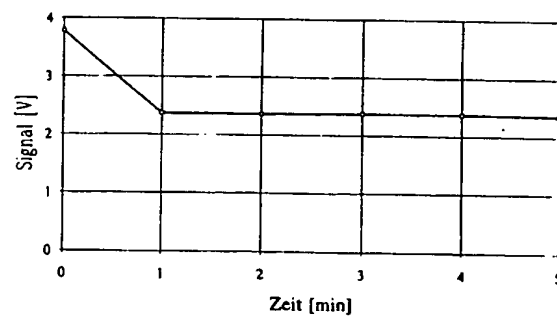
Koch, Alexander, Dipl.-Lebensmitteling. Dr., 7500
Karlsruhe, DE

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

H. WEISSER, Zeitschrift für Lebensmittel-
technologie 28(1977)3, S. 97-101;
S.A. JONES, BRUKER minispec application
note 17(1) 1983;
P.J. BARKER, BRUKER minispec application
note 32(2) 1988;
P.N. TIWARI und W.BURK, J. American Oil
Chemist's Soc. 57(1979)3, S. 119-121;
A. MONTAG, Deutsche
Lebensmittel-Rundschau 69(1973)12, 470-472;

⑤④ Verfahren zur Bestimmung des Fett- oder Ölgehalts

⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Bestimmen des
Fettgehalts in stark wasserhaltigen Substanzen, insbesonde-
re in Nahrungsmitteln, mit Hilfe eines niedrigauflösenden
Kernresonanzspektrometers. Vor der NMR-Messung wird
die Substanz mit einem chemischen Trocknungsmittel,
vorzugsweise mit CaO-Pulver, gemischt.



DE 41 33 643 C 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Bestimmen des Fett- oder Ölgehalts in stark wasserhaltigen Substanzen, insbesondere in Nahrungsmitteln, mit Hilfe eines NMR-Puls-Spektrometers, nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1.

Ein solches Verfahren ist beispielsweise bekannt aus dem Artikel von H. Weisser in der Zeitschrift für Lebensmitteltechnologie 28 (1977) 3, Seiten 97 – 101.

Die Bestimmung des Fettgehalts mit einem niedrigauflösenden Kernresonanz-Puls-Spektrometer mit einer magnetischen Feldstärke von maximal etwa 1 Tesla und mittlerer Homogenität von etwa 10^{-5} über das Probenvolumen und damit einer Protonenresonanzfrequenz unter etwa 50 MHz, z. B. dem MINISPEC der Firma BRUKER, ist in Produkten mit einem Wassergehalt von beispielsweise über 13% wegen der Überlagerung von Wasser- und Fettsignal nicht möglich, da bei höherem Wassergehalt der Beitrag des Wassers zum Gesamtsignal weit überproportional ansteigt. Die Bestimmung im unveränderten Produkt mittels der Kernresonanz bleibt den hochauflösenden Geräten vorbehalten, welche für diese Anwendung allein aber viel zu teuer sind.

Für kleine Feuchtigkeitsanteile im Bereich einiger Prozent liefert auch ein niedrigauflösendes Gerät hinreichend verlässliche Werte, da der Beitrag des Wassersignals dann nach etwa 1 ms praktisch vollständig abgeklungen ist und es daher möglich ist nur den Fett- bzw. Ölanteil zu messen. Durch Kombination zweier Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Anregungspuls wird es sogar möglich, neben dem Fettgehalt auch den Feuchtigkeitsgehalt quantitativ zu bestimmen (vgl. die Artikel von S. A. Jones in BRUKER minispec application note 17 (1) 1983, P. J. Barker in BRUKER minispec application note 32 (2) 1986 und P. N. Tiwari und W. Burk in J. American Oil Chemist's Soc. 57, No. 3, Seiten 119 – 121 (1979)). Diese Methode versagt jedoch bei größeren Wasseranteilen, da diese vergleichbare Spin-Spin-Relaxationszeiten T_2 haben wie der Fettanteil und sich damit die Signalanteile praktisch nicht mehr trennen lassen.

Um dennoch auf einem niedrigauflösenden Gerät diese Bestimmung durchzuführen, war es bisher nötig, das Wasser durch Vortrocknen in einem Ofen, z. B. einem Trockenschrank, Vakuumofen, Mikrowellenofen oder dergleichen, zu entfernen. Von Nachteil sind hierbei der apparative Aufwand und die Dauer des Verfahrens.

Aufgabe der Erfindung ist daher, ein Verfahren der eingangs genannten Art dahingehend weiterzubilden, daß der apparative und zeitliche Aufwand verringert werden.

Diese Aufgabe wird durch die kennzeichnenden Merkmale im Anspruch 1 dadurch gelöst, daß das Wasser aus dem Produkt mittels chemischer Trocknung zumindest teilweise entfernt wird.

Durch die chemische Entfernung des Wassers und damit des überlagerten Wassersignals kann das durch das Fett verursachte Signal schnell, einfach und eindeutig gemessen werden. Es ist hierbei unwesentlich, ob das Wasser vollständig entfernt wurde. Wichtig ist nur, daß der Wassergehalt nach der chemischen Trocknung unter einem vorgegebenen Wert liegt. Dieser Schwellwert orientiert sich an dem Anteil von in der Substanz fester gebundenen Wassers. Als brauchbarer Schwellwert hat sich experimentell etwa 13% herausgestellt.

Ein bevorzugtes chemisches Trocknungsmittel soll

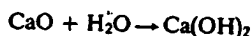
möglichst gut folgende Kriterien erfüllen:

1. Es soll ebenso wie sein Reaktionsprodukt im Meßbereich kein NMR-Signal ergeben.
2. Es soll ebenso wie sein Reaktionsprodukt ungiftig und umweltverträglich sein.
3. Es soll möglichst viel Wasser schnell binden.
4. Die freiwerdende Reaktionswärme darf zu keiner Gefährdung des Personals führen.
5. Es soll billig sein.

Eine Chemikalie, die diese Eigenschaften weitgehend hat, ist Kalziumkarbid. Das Reaktionsprodukt ist das leicht brennbare Azetylen, weswegen bei Verwendung von Kalziumkarbid unter dem Abzug gearbeitet werden sollte. Dies ist auch deshalb geboten, weil die Gefahr besteht, daß sich durch Verunreinigungen neben Azetylen auch Phosphorwasserstoff bildet, der zumindest unangenehm riecht und in höheren Konzentrationen auch giftig ist.

In einem besonders bevorzugten Verfahren wird als Trocknungsmittel Kalziumoxid (CaO), gebrannter Kalk, verwendet. Diese Substanz erfüllt alle fünf geforderten Kriterien, ohne die Nachteile des Kalziumkarbids aufzuweisen.

Die zugrundeliegende Reaktion mit Wasser läßt sich folgendermaßen formulieren:



Die bei dieser Reaktion freiwerdende Wärme ist nicht ausreichend, um zu einer Gefährdung zu führen. Sie reicht aber aus, eine Probe mittleren Wassergehalts von Zimmertemperatur aus deutlich zu erwärmen, so daß im Bedarfsfall nur noch kurze Zeit temperiert werden muß, bis die für die Bestimmung notwendige Meßtemperatur erreicht ist. Diese beträgt üblicherweise 40 Grad Celsius.

Im folgenden soll die Erfindung anhand eines Beispiels näher erläutert werden.

Es versteht sich, daß die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in der jeweils angegebenen Kombination sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung verwendbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

Zunächst wird im allgemeinen das Spektrometer mit Hilfe von Substanzen bekannten Fettgehalts kalibriert. Der zeitliche Ablauf und ganz allgemein die Meßparameter sollten dabei weitgehend identisch mit den späteren Messungen sein. Als vorteilhaft hat sich folgende Vorgehensweise erwiesen. Ein Glasröhrchen von bspw. 30 mm Höhe wird nicht ganz zur Hälfte mit der Eichprobe bekannten Fettgehalts befüllt und die Einwaage notiert. Etwa die gleiche Masse CaO -Pulver wird zugegeben, so daß das Röhrchen nicht ganz gefüllt ist. Dieses Massenverhältnis hat sich für einen weiten Bereich von Mayonnaiseproben mit Wassergehalten von 17% bis 65% als angebracht erwiesen. Die Menge von zugegebenem CaO muß sich an dem maximal zu erwartenden Wassergehalt (z. B. 65%) orientieren und sollte so bemessen sein, daß sich die entsprechende Wassermenge vollständig mit dem CaO umsetzen kann. Ein Überschuß an CaO ist an sich unschädlich, verschlechtert nur den Füllfaktor bei der Messung. Allerdings muß der CaO -Anteil mindestens ausreichen, um nach der Reaktion den Wassergehalt unter den Schwellenwert von z. B. 13% zu bringen.

Nach der Reaktion mit Wasser vergrößert sich das Gesamtvolumen aufgrund der geringeren Dichte von Kalziumhydroxid, so daß die Sollfüllhöhe von etwa 30 mm in etwa erreicht wird. Mit einem Spatel wird sorgfältig verrührt. Am Spatel noch anhaftendes Material wird mit ein wenig Papier abgestreift. Das Papier soll trocken sein, damit im Meßbereich kein zusätzliches Wassersignal erzeugt wird. Das Papier wird auf die Probe im Probenröhrchen gedrückt und verbleibt im Röhrchen. Danach hat sich die Probe spürbar erwärmt und wird in einem kurzen Temperierschritt nur noch auf die Meßtemperatur gebracht. Dieser Temperierschritt kann jedoch auch entfallen.

Das Protonen-NMR-Signal wird nun gemessen und in einer Tabelle dem bekannten Fettgehalt zugeordnet. Dieses Eichverfahren wird mit mehreren (i.a. mindestens drei) Eichsubstanzen durchgeführt. Dies liefert einen im interessierenden Bereich zu interpolierenden Zusammenhang zwischen NMR-Signal, normiert auf die Masse der Eichprobe, und Fettgehalt. Dieser Zusammenhang wird im Computer des Spektrometers z. B. in Tabellen- oder analytischer Form abgespeichert. Es ist zu betonen, daß die Eichung, eine ausreichende CaO-Menge vorausgesetzt, unabhängig ist vom Wassergehalt der Eichproben, wie ja auch später die Messungen unabhängig vom Wassergehalt der Meßproben sein sollen.

Eine Eichung kann, wenn sie einmal erstellt ist, über lange Zeit verwendet werden, solange sich am Meßverfahren, apparativ und an den Randbedingungen nichts ändert. Selbstverständlich empfiehlt es sich, die Eichung von Zeit zu Zeit zu überprüfen.

Bei der anschließenden Messung unbekannter Produkte wird genauso verfahren. Das gemessene und auf die Probenmasse normierte NMR-Signal wird jedoch mit der gespeicherten Eich-tabelle bzw. Eichkurve verglichen und daraus ein Fettgehalt ermittelt, der angezeigt wird.

Die Meßsequenz für die Kalibrierung und Messung ist i.a. eine Spin-Echo-Sequenz, d. h. auf einen Anregungs-HF-Impuls (i.a. ein 90 Grad-Impuls) folgt nach einer Wartezeit im ms-Bereich, z. B. nach 3 ms, ein i.a. um 90 Grad phasenverschobener 180 Grad-Impuls, worauf nach nochmals derselben Wartezeit von z. B. weiteren 3 ms ein Spin-Echo detektiert werden kann. Es reicht dazu aus, zum vorbekannten Zeitpunkt des Auftretens des Spin-Echos einen Meßpunkt zu nehmen. Details über die Pulssequenzen finden sich in Lehrbüchern der Kernresonanz. Ein Spektrometer, an dem sich die Erfindung durchführen läßt, ist im Katalog "minispec pc 100" (September 1990) der Firma Bruker Analytische Meßtechnik GmbH beschrieben. Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses können durch wiederholte 180 Grad-Impulse mehrere Echos erzeugt und akkumuliert werden oder es kann die Messung jeweils nach einer Wartezeit, die groß ist gegen die maximale Spingitter-Relaxationszeit der Probe (einige Sekunden), wiederholt und akkumuliert werden. Die Spin-Echo-Methode ist deshalb auch besonders vorteilhaft, weil zum Zeitpunkt des Echos, z. B. nach 6 ms, Signalanteile z. B. in Lipidform fester gebundener Wassermoleküle mit entsprechend kurzer Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 bereits abgeklungen sind. Offenbar bleiben nach einem Trocknungsvorgang, der bis unter einen Schwellenwert von z. B. 13% Wasseranteil führt, vorwiegend gebundene H_2O -Moleküle übrig, so daß der Anteil des Wassersignals am Spin-Echo-Signal überproportional auf einen vernachlässigbaren Wert abgenommen hat. Dieser Be-

fund wurde experimentell für eine Vielzahl von Mayonaisesorten bestätigt, er trifft aber auch für andere Festkörper-Flüssigkeitsmischungen zu (vgl. z. B. den oben genannten Artikel von H. Weisser).

Die Kalibrierung und die Messung erfordern pro Probe einen Zeitaufwand von weniger als fünf Minuten, so daß es sich hier um eine Schnellmethode handelt. Andere Schnellmethoden (z. B. die Foss-Let-Methode; A. Montag in Deutsche Lebensmittelrundschauf Band 69, ab Seite 470, 1973: "Zur densitometrischen Fettbestimmung mit dem Foss-Let-Gerät") erfordern mindestens 15 Minuten und benötigen darüberhinaus weitaus schädlichere Chemikalien.

Die Abbildungen sollen zeigen, wie sich der zeitliche Verlauf des chemischen Trocknungsvorgangs in der Spin-Echo-Amplitude niederschlägt (Fig. 1) und wie für eine Reihe von Eichsubstanzen die Spin-Echo-Amplitude (im getrockneten Zustand) vom Fettgehalt abhängt (Fig. 2).

Im einzelnen zeigt Fig. 1 für eine typische Mayonnaise die Abhängigkeit der Spin-Echo-Amplitude von der Zeit nach dem Mischen mit CaO. Es wurde eine Spin-Echo-Sequenz mit 90 Grad-Anregungsimpuls, einer Wartezeit von 3 ms und einem um 90 Grad phasenverschobenen 180 Grad-Impuls verwendet, so daß das Spin-Echo 6 ms nach dem 90-Grad-Impuls auftrat. Für jeden gezeigten Meßpunkt wurde die Sequenz dreimal wiederholt und akkumuliert.

Zunächst nimmt die Amplitude schnell deutlich ab, d. h. es wird Wasser entzogen und mit dem CaO zu $Ca(OH)_2$ umgesetzt. Dieser Anteil kann nun nicht mehr zum Signal beitragen. Es zeigt sich aber, daß bereits nach einer Minute der Trocknungsvorgang soweit abgeschlossen ist, daß er sich nicht mehr in einer weiteren Abnahme des Signal äußert, d. h. die Wasserkonzentration ist soweit abgesunken, daß das Wasser, das sich möglicherweise noch nicht mit dem CaO umgesetzt hat, in der Mayonnaise selbst so gebunden ist, daß es wegen seiner kurzen T_2 -Zeit keinen nennenswerten Beitrag zum Spin-Echo (nach 6 ms) mehr liefern kann.

Fig. 2 zeigt für drei Eich-Mayonnaisen mit den Fettgehalten 20%, 50% und 80% die Amplitude des Spin-Echo-Signals normiert auf jeweils exakt ein Gramm Mayonnaise. Die drei Meßpunkte liegen sehr gut auf einer Geraden, die jedoch nicht genau durch den Nullpunkt geht. Im Bereich von 20% bis 80% kann demnach einfach linear interpoliert werden. Andererseits ist offensichtlich, daß für kleinere Konzentrationen die Eichmessung nicht einfach linear extrapoliert werden kann. Man muß sich entweder auf den explizit erfaßten Bereich beschränken oder die Eichung durch zusätzliche Stützpunkte ergänzen, um den nicht-linearen Bereich hinreichend genau zu beschreiben.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Bestimmen des Fett- oder Ölgehalts in stark wasserhaltigen Substanzen mit einem NMR-Puls-Spektrometer dadurch gekennzeichnet, daß vor der Messung im Spektrometer die Substanz durch Mischen mit einem chemischen Trocknungsmittel getrocknet wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß die chemische Trocknung durch Mischen mit Kalziumkarbid erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß die chemische Trocknung durch Mischen mit gebranntem Kalk, CaO, erfolgt.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß das NMR-Puls-Spektrometer niedrigauflösend ist, d. h. eine Protonenresonanzfrequenz von maximal 50 MHz und eine Magnetfeldinhomogenität über das Meßvolumen von mindestens 10^{-5} aufweist. 5
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß mit dem NMR-Puls-Spektrometer ein Protonen-Spin-Echo-Signal der Substanz gemessen wird. 10
6. Verfahren nach Anspruch 5 dadurch gekennzeichnet, daß vor der Messung des Spin-Echo-Signals der Substanz das Protonen-Spin-Echo-Signal mindestens einer, vorzugsweise mehr als zweier, Eichsubstanz(en) mit bekanntem Fett- oder Ölgehalt gemessen wird und der Fett- oder Ölgehalt der Substanz aus dem Vergleich der Spin-Echo-Amplituden von Eich- und Substanzmessungen ermittelt wird. 15
7. Verfahren zum Bestimmen des Fett- oder Ölgehalts in stark wasserhaltigen Substanzen nach einem der vorhergehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte: 20
- a) Einwiegen einer Menge einer Eichsubstanz bekannten Fett- oder Ölgehalts; 25
 - b) Mischen dieser Menge mit einer Menge eines chemischen Trocknungsmittels, insbesondere CaO-Pulver, die ausreicht, den Wassergehalt der Eichsubstanz unter einen vorgegebenen Schwellwert, insbesondere unter 13%, zu bringen; 30
 - c) Durchführung einer Kernresonanzmessung, insbesondere einer Protonen-Spin-Echo-Messung, an dem durchreagierten Gemisch; 35
 - d) Bestimmung der Kernresonanzsignalamplitude; 40
 - e) Normierung dieser Amplitude auf die Masse der eingewogenen Eichsubstanz;
 - f) Abspeichern des Wertes der normierten Amplitude; 45
 - g) Wiederholen der Schritte a) bis f) für n Eichsubstanzen ($n \geq 0$);
 - h) Berechnen einer Eichtablette oder Eichkurve aus den normierten Amplituden des Schrittes f), die den Zusammenhang zwischen Fett- oder Ölgehalt und normierter Amplitude des Kernresonanzsignals liefert; 50
 - i) Wiederholen der Schritte a) bis f), wobei die Eichsubstanz durch eine Meßsubstanz unbekannten Fett- oder Ölgehaltes ersetzt ist;
 - j) Berechnen der Fett- bzw. Ölkonzentration der Meßsubstanz aus der gemessenen normierten Amplitude des Kernresonanzsignals und der Eichtablette bzw. Eichkurve; 55
 - k) Anzeigen oder Abspeichern der Fett- bzw. Ölkonzentration für die Meßsubstanz;
 - l) Wiederholen der Schritte i) bis k) für m Meßsubstanzen ($m \geq 0$). 60
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanz ein Nahrungsmittel ist. 65
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Nahrungsmittel eine Mayonnaise ist.

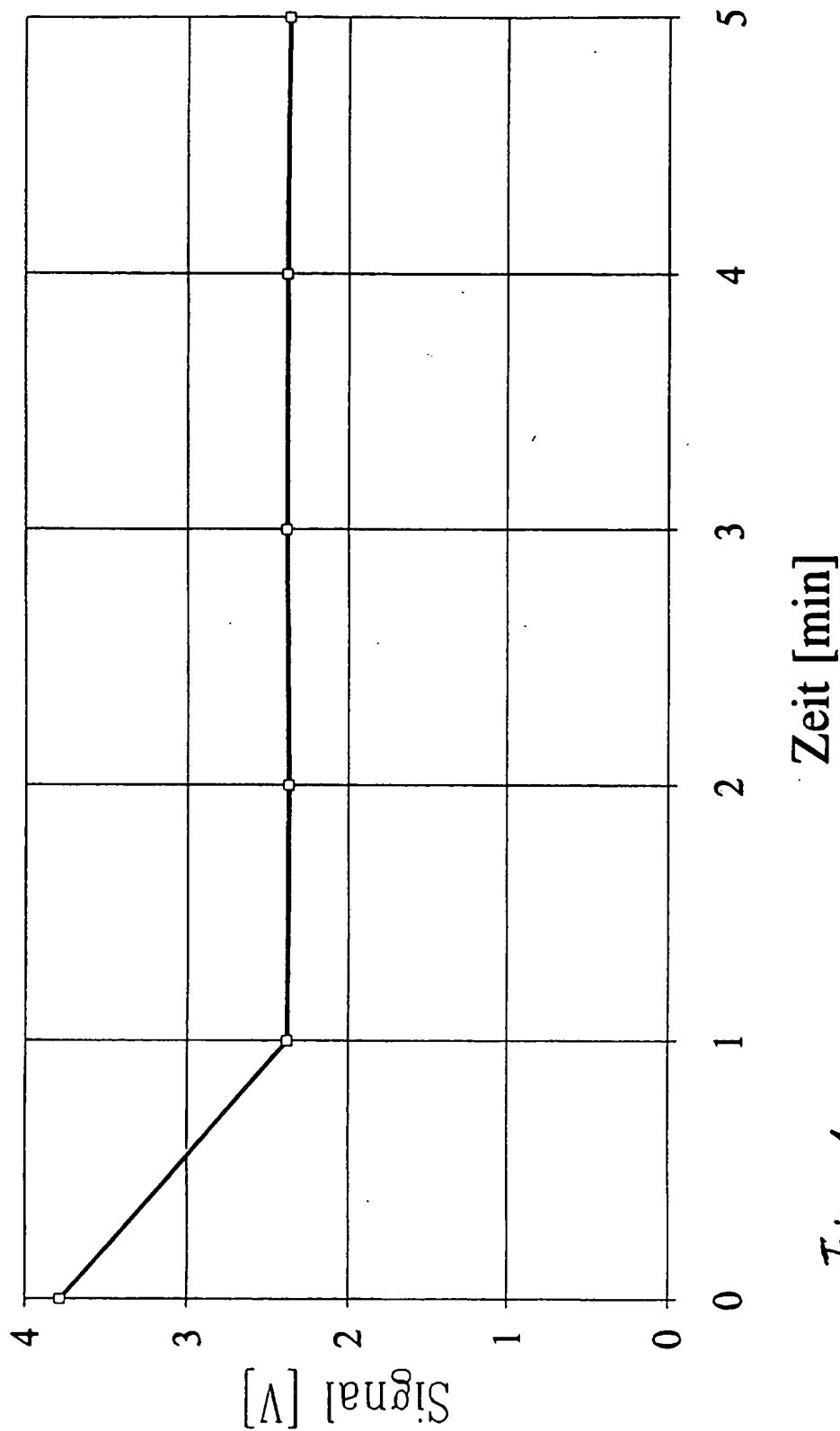


Fig. 1

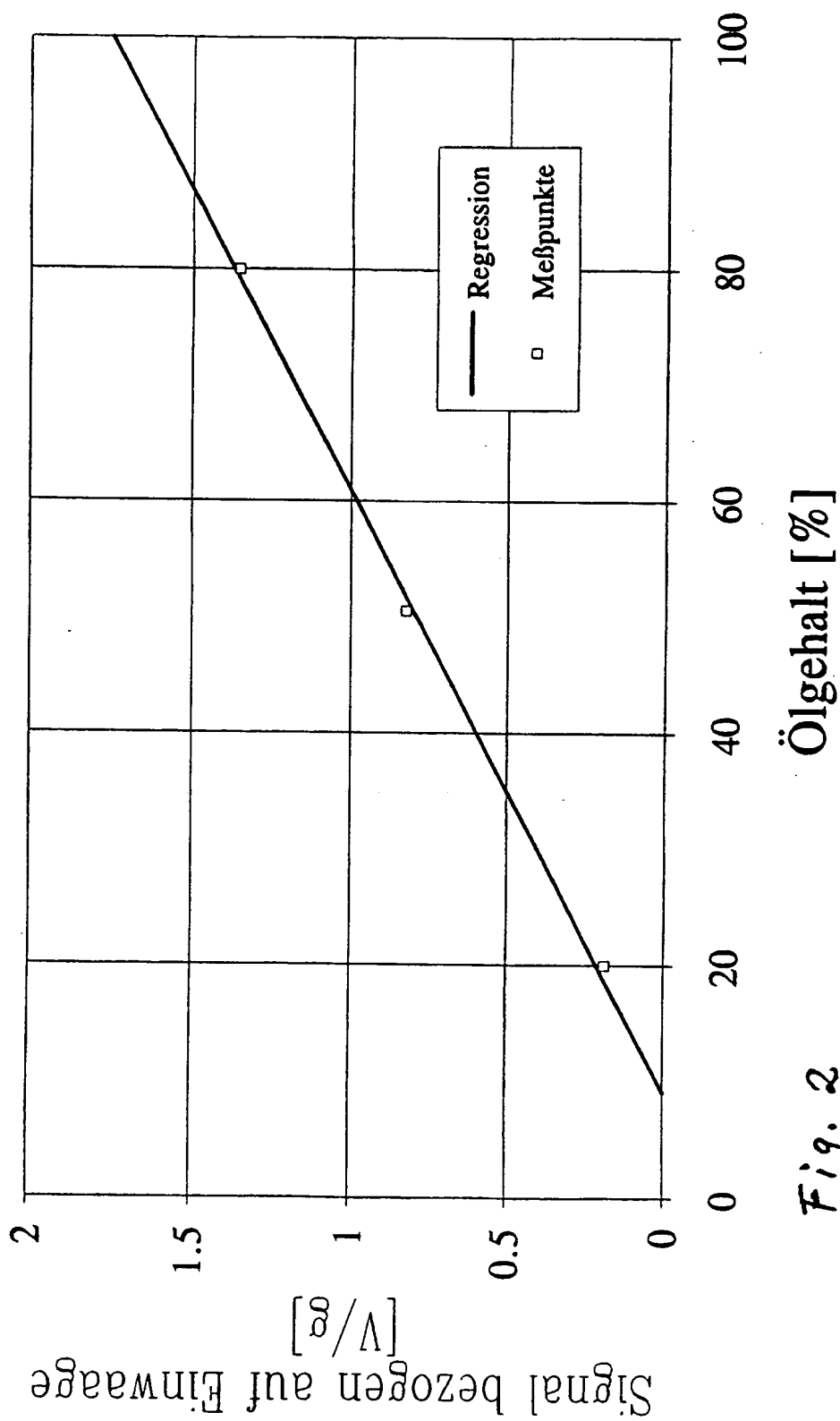


Fig. 2